

ОТЗЫВ

официального оппонента кандидата химических наук, доцента

Шутовой Татьяны Геннадьевны

на диссертационную работу Фань Фань

**«СИНТЕЗ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ
БИОКОНЬЮГАТОВ»,**

представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук
по специальности 02.00.04 – Физическая химия

1. Соответствие диссертации специальности и отрасли науки, по которым она представлена к защите, со ссылкой на область исследования паспорта соответствующей специальности, утвержденного ВАК.

Содержание диссертации Фань Фань «Синтез и физико-химические свойства флуоресцентных биоконъюгатов» соответствует Паспорту специальности 02.00.04 – Физическая химия согласно Приказу Высшей аттестационной комиссии Республики Беларусь от 7 октября 2024 г. № 235, а именно: I. Отрасль науки, по которой присуждается ученая степень: Химические науки, II. Формула специальности: Физическая химия, как область химической науки, предметом которой является изучение химических объектов и явлений с использованием экспериментальных и теоретических методов физики; III. Области исследований: пункт 5. Строение молекул, теория химических связей и межмолекулярных взаимодействий, молекулярное моделирование; пункт 7. Закономерности изменения структуры и состава химических систем в условиях внешних полей, высоких и экстремально высоких температур и давлений, низких и сверхнизких температур, комбинированных физических и физико-химических воздействий; гетерогенные и гомогенные фотокаталитические и сонохимические процессы, электрохимические и фотоэлектрохимические процессы на полупроводниках, гетерогенный катализ; хемилюминесценция, фото-, электро- и сонолюминесценция в ходе химических превращений; химические источники тока.

2. Актуальность темы диссертации.

Диссертационная работа Ф. Фань «Синтез и физико-химические свойства флуоресцентных биоконъюгатов» посвящена актуальной теме дизайна новых

флуоресцентных меток на основе ксантеновых и цианиновых красителей, отличающихся высокими квантовыми выходами флуоресценции в составе конъюгатов с белками и олигонуклеотидами, а также системному анализу факторов, влияющих на спектральные характеристики известных красителей ксантенового и цианинового ряда и их новых синтезированных производных, таких как структура молекул красителя и мишени, рН, вязкость, температура среды и присутствие поверхностно-активных веществ и двухзарядных катионов в растворе.

Актуальность темы связана с высокой востребованностью высокочувствительных неизотопных методов детектирования биомолекул, к числу которых относится мечение их флуоресцентными красителями. Флуоресцентные метки используются для визуализации биологических мишеней в живых организмах, изучения структур нуклеиновых кислот, белок-белковых взаимодействий, во флуоресцентном иммуноанализе, для детектирования ферментов и некоторых ионов, мониторинга амплификации полимеразной цепной реакции и секвенирования ДНК. Знание особенностей флуоресценции красителей в зависимости от структуры молекул и внешних параметров позволяет выбрать метку с оптимальными характеристиками для решения конкретных экспериментальных задач.

Высокая актуальность исследования подтверждается тем, что работа соответствует приоритетным направлениям научно-технической деятельности в Республике Беларусь на 2016-2020 годы, утвержденных Указом Президента Республики Беларусь от 22 апреля 2015 г. № 166 (п.5 «Химические технологии, нефтехимия: производство новых химических продуктов») и приоритетным направлениям научной, научно-технической и инновационной деятельности на 2021-2025 годы, утвержденным Указом Президента Республики Беларусь от 7 мая 2022 г. № 156 (п.2 «Биологические, фармацевтические и химические технологии и производства: тонкий химический синтез»).

3. Степень новизны результатов диссертации и научных положений, выносимых на защиту.

Научная новизна результатов, полученных в диссертации не вызывает сомнений. Положения, выносимые соискателем на защиту, в достаточной

степени отражают новизну исследования и подтверждены экспериментальными результатами.

Соискателем в ходе выполнения диссертационного исследования получены два новых производных красителей ксантенового ряда – бифлуорофоры (5-FAM)₂ и (6-FAM)₂ с фрагментами 5-флуоресцеина и 6-флуоресцеина, соответственно, расположенными “голова-к-голове” относительно друг друга и связанными через линкер - 3,5-диаминобензойную кислоту, карбоксильная группа которой предварительно превращена во вторичный реакционноспособный амид реакцией с 3-азидопропиламином-1, а также семи новых производных цианиновых красителей Cy5 и Cy7 с различным положением, длиной и структурой линкера с концевой азидной группой. Разработаны методики конъюгирования красителей с белками, ДНК-олигонуклеотидами и полиэтиленгликолем с использованием реакции азид-алкинового присоединения, что является несомненным достоинством экспериментальной части работы. Реакции азид-алкинового присоединения протекает в мягких условиях, в которых изменения нативной структуры белков и олигонуклеотидов минимально.

Признаками новизны обладает использованный в диссертации подход к дизайну молекул бифлуорофоров (5-FAM)₂ и (6-FAM)₂, который позволяет вводить эквивалент двух флуорофоров в один сайт модифицируемого белка с незначительной потерей квантового выхода, сохраняя высокую интенсивность флуоресценции за счет более высокого коэффициента экстинкции.

Впервые проведен сравнительный анализ спектральных характеристик 5- и 6-флуоресцеинов и их производных бифлуорофоров (5-FAM)₂ и (6-FAM)₂ в зависимости от микроокружения: концентрации поверхностно-активного соединения Triton X-100, ионной силы раствора, присутствия двухзарядных катионов, температуры и pH, а для (6-FAM)₂ еще в зависимости и от вязкости водно-глицериновой смеси. Установлено, что конъюгация бифлуорофора (5-FAM)₂ с белками приводит к снижению относительного квантового выхода флуоресценции на 20-40%.

Впервые систематизированы данные о влиянии микроокружения (вязкости, добавки солилизатора) и структуры молекул (наличие сульфогруппы, конъюгирование с олигонуклеотидом T10 или полиэтиленгликолем) на флуоресцентные свойства цианиновых красителей Cy3

и Су5 в водных растворах, а наблюдаемые эффекты объяснены изменениями растворимости и внутримолекулярной свободы вращения молекул красителя.

На примере новых синтезированных соискателем производных красителей Су5 и Су7 с заместителями в различных местах индольного кольца и метиновом мостике, показана возможность тонко управлять положением максимумов в спектрах поглощения и флуоресценции водных растворов красителей. Показано, что после конъюгации с ДНК спектры поглощения всех производных красителей Су5 и Су7 сдвигаются в длинноволновую область, причем сдвиг больше для одноцепочечной ДНК, чем для двухцепочечной.

Впервые интеркаляция красителя Sybr Green I в двухцепочечную ДНК исследована с использованием метода гомологичного флуоресцентно-резонансного переноса энергии (homo-FRET), установлена нелинейная зависимость анизотропии флуоресценции и времени жизни возбужденного состояния от концентрации красителя.

4. Обоснованность и достоверность выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

Выводы и рекомендации, сформулированные в диссертации, являются достаточно обоснованными и достоверными, что подтверждается соответствующими результатами исследований, выполненных соискателем на высоком уровне с использованием современных физико-химических методов анализа: спектроскопии ЯМР ^1H и ^{13}C , спектроскопии поглощения в видимой области и флуоресцентной спектроскопии. Диссертационная работа выполнена на хорошем научном уровне с учетом современных знаний о строении и свойствах флуоресцентных красителей и моделей их взаимодействия с биомолекулами. Методика проведения экспериментов в целом соответствует принятым в химии стандартам. Интерпретация полученных данных и сделанные выводы не вызывают сомнений.

Результаты диссертационной работы представлялись и обсуждались со специалистами на двух конференциях по профилю диссертации: XIII Международной научно-технической конференции «Квантовая электроника», Минск, 2021 и the 12th International Conference on Photonics and Application (ICPA-12), Vung Tau, Vietnam, 2022.

5. Научная, практическая, экономическая и социальная значимость результатов диссертации с указанием рекомендаций по их использованию

Научная значимость результатов диссертации Ф. Фань состоит в:

- разработке дизайна молекул бифлуорофоров с усиленной флуоресценцией на основе анализа физико-химических свойств двух изомеров карбоксифлуоресцеина, установлении флуоресцентных свойств бифлуорофоров и влияющих на них факторов, что позволило предложить (5-FAM)₂, обладающий более высоким квантовым выходом и стабильностью по сравнению с коммерчески доступными реагентами, для флуоресцентного мечения синтетических олигонуклеотидов в мелкотоварном производстве. Соискателем показано, что квантовый выход флуоресценции бифлуорофора карбоксифлуоресцеина (5-FAM)₂ в воде в 2,4 раза выше, чем у его аналога (6-FAM)₂, а время жизни возбужденного состояния составляет 4,6 нс и не зависит от концентрации ПАВ Triton X-100 в диапазоне 0÷100 мМ. Для (6-FAM)₂ время жизни возбужденного состояния резко возрастает с ростом концентрации ПАВ, достигая максимального значения 3,75 нс при 20 мМ ПАВ. На флуоресценцию (5-FAM)₂ не влияют ионная сила раствора и добавки двухзарядных катионов в концентрации до 5 мМ, в то время как интенсивность флуоресценции (6-FAM)₂ в этих условиях снижается. (5-FAM)₂ также демонстрирует менее выраженное, чем у (6-FAM)₂, снижение интенсивности флуоресценции с ростом температуры в диапазоне 25–60 °С, и с уменьшением рН в диапазоне 6–10. Показано, что снижение квантового выхода флуоресценции (5-FAM)₂ после конъюгирования с бычьим сывороточным альбумином (БСА) и иммуноглобулином человека (IgG), компенсируется более высоким коэффициентом экстинкции бифлуорофора, что приводит к сравнимой с карбоксифлуоресцеинами или большей интенсивности эмиссии флуоресценции конъюгатов.

В приложении диссертации имеется акт внедрения в собственное производство ОДО «Праймтех», г. Минск, Республика Беларусь Технологии флуоресцентного мечения синтетических олигонуклеотидов бифлуорофором флуоресцеина (5-FAM)₂, что подтверждает высокую научную и практическую значимость результатов диссертационной работы. В основу технологии положены методики синтеза и применения реагента, разработанные

соискателем Ф. Фань в результате выполнения диссертационного исследования в Лаборатории химии биоконъюгатов ГНУ «Институт физико-органической химии Национальной академии наук Беларуси» в период с 2020 до 2025 год. Полученные результаты использованы при выполнении хоздоговорных работ с Курчатовским институтом и Сколковским институтом науки и технологии (Россия).

- систематическом исследовании спектральных свойств цианиновых красителей Су3, Су5 и Су7 и установлении факторов, позволяющих повысить их флуоресценцию в водных растворах. Так, повышение растворимости путем введения сульфогруппы в структуру красителя или добавление к раствору красителя 0,25 % Tween-20 в качестве солюбилизатора в 3-5 раз увеличивает интенсивность флуоресценции Су3 и Су5. Увеличение вязкости среды при введении в нее 10-70 % глицерина и конъюгирование с растворимыми олигонуклеотидом Т10 или полиэтиленгликолем увеличивают относительный выход флуоресценции цианиновых красителей, поскольку замедляется внутримолекулярное вращение и цис-транс изомеризация их молекул.

- установлении влияния положения и структуры заместителей в различных местах индольного кольца и метиновом мостике на спектральные свойства новых производных красителей Су5 и Су7. Установлено, что Су5 и все его производные, имеют максимум поглощения около 640 нм, в то время как производные Су7 с заместителями, присоединенным к азоту индольного кольца, демонстрируют максимум поглощения при 756-757 нм, а с заместителем на метиновом мостике, содержащем атом серы – около 776 нм. При этом Стоксов сдвиг определяется структурой основного флуоресцентного фрагмента и составляет 15-17 нм и 22-25 нм для производных Су5 и Су7 соответственно.

- установлении влияния структуры ДНК-олигонуклеотидов на положение максимумов в спектрах поглощения и эмиссии флуоресценции конъюгированных с ними производных красителей Су5 и Су7. Показано, что спектры поглощения конъюгатов сдвигаются в длинноволновую область на 3-12 нм и зависят от структуры красителя, причем сдвиг больше для

одноцепочечной ДНК, чем для двухцепочечной. При конъюгировании с ДНК интенсивность флуоресценции производных красителей возрастает в 1,5–2,5 раза, причем с одноцепочечной ДНК она выше, чем с двухцепочечной, за исключением производных Cy5-с и Cy7-b,d, линкер которых содержит триэтиленгликолевый фрагмент.

- установлении зависимости флуоресцентных свойств интеркаляционного красителя Sybr Green I от соотношения концентраций красителя и двухцепочечной ДНК, что позволило предположить протекание гомологичного флуоресцентно-резонансного переноса энергии (Homo-FRET) в условиях эксперимента. В результате межмолекулярных взаимодействий красителя с двухцепочечной ДНК наблюдается нелинейный рост интенсивности флуоресценции красителя, связанного с дцДНК, с выходом на плато и уменьшение анизотропии флуоресценции с 20 до 8% с увеличением соотношения концентраций красителя и дцДНК до 2,0, что свидетельствует о наличии в системе процессов концентрационного тушения флуоресценции и самотушения флуоресценции интеркалированного красителя.

Полученные Ф. Фань результаты существенно расширяют имеющиеся представления физической химии о спектральных характеристиках ксантеновых и цианиновых красителей, используемых для мечения биомолекул, в зависимости от структуры флуоресцентного фрагмента молекул, мишени, длины и структуры линкера, и влияния на них микроокружения (вязкости, поверхностно-активных веществ, ионной силы, многозарядных ионов, pH).

6. Опубликованность результатов диссертации в научной печати

Основные результаты диссертации опубликованы в 8 научных работах, в том числе в 6 статьях в рецензируемых научных изданиях, соответствующих требованиям ВАК Республики Беларусь для опубликования результатов диссертационных исследований, из них 5 статей в зарубежных научных журналах, общим объемом 5,8 авторского листа и тезисы 2 докладов на международных конференциях, что свидетельствует о высоком научном уровне данной диссертационной работы.

7. Соответствие оформления диссертации требованиям ВАК.

Оформление диссертационной работы и автореферата Ф. Фань соответствует требованиям ВАК Республики Беларусь. Диссертация содержит следующие структурные элементы: титульный лист, оглавление, перечень сокращений и обозначений, введение, общую характеристику работы, основную часть из пяти глав, заключение, список использованных источников и приложение. Перечень структурных элементов диссертации, их объем и содержание соответствуют пунктам 5-19, 20-31, 44-51 «Инструкции о порядке оформления квалификационной научной работы (диссертации) на соискание ученых степеней кандидата и доктора наук, автореферата и публикаций по теме диссертации» (Постановление Высшей аттестационной комиссии Республики Беларусь от 28 февраля 2014 г. №3 (в редакции постановления Высшей аттестационной комиссии Республики Беларусь 22.08.2022 №5), приложениям 1 и 2 к «Инструкции о порядке оформления диссертации».

Полный объем диссертации составляет 112 страниц, включая Приложение, в том числе 67 рисунков и 5 таблиц. Библиографический список использованных источников из 198 наименований и список публикаций соискателя из 8 наименований занимает 16 страниц.

Во введении обоснованы актуальность темы, сформулированы цели и задачи работы, обоснована научная новизна и практическая ценность выполненного исследования, сформулированы положения, выносимые на защиту. Глава 1 традиционно посвящена анализу литературных источников по теме исследования. В ней описываются основные принципы флуоресценции, применение флуоресцентных меток для анализа структуры биомолекул и мониторинга реакций *in vitro*; синтез, структура молекул и свойства ксантеновых и цианиновых красителей. В главе 2 перечислены использованные реагенты, оборудование, а также описаны методики синтеза новых производных красителей и методики их конъюгирования с белками и ДНК с использованием реакции азид-алкинового присоединения, а также методики исследования флуоресценции. Результаты, полученные в ходе выполнения диссертационной работы, изложены в главах с третьей по пятую, материал разделен логически на три части в соответствии с группой использованных красителей. В заключении сформулированы выводы и даны рекомендации по практическому использованию результатов.

8. Замечания по диссертации

Несмотря на общую положительную оценку, диссертационное исследование не лишено недостатков, к числу которых можно отнести следующее:

1. В методической части работы глава 2 в недостаточной степени описаны условия записи спектров флуоресценции, такие как ширина щелей источника и фотоприемника, шаг и скорость записи и другие параметры, которые могут влиять на интенсивность и форму спектра флуоресценции, записанных в различных режимах. Кроме того, длины волн возбуждения флуоресценции красителей (475 нм для флуоресцеиновых (с. 52), 745 и 765 нм для Су7-а,b и Су7-с,d (с.83), 638-641 нм (таблица 4.2) и 648 нм (с.84) для производных Су5 попадают в диапазон регистрации спектров эмиссии флуоресценции соответствующих соединений: флуоресцеиновых красителей на рис. 3.1 (диапазон 460-740 нм), цианиновых красителей на рис. 4.1, 4.2, 4.5 (700-1000 нм) и 4.6 (600-900 нм), чего обычно избегают при регистрации флуоресценции. В подписях к рисункам, на которых приведены спектры эмиссии, не указаны соответствующие длины волн возбуждения флуоресценции.

2. Неудачно выбрано оформление иллюстративного материала, а именно, слишком мелкий шрифт на рисунках 3.4, 3.5, 3.6, 4.5, 4.6, узкие, плохо различимые в печатном экземпляре линии на рис. 3.4, 3.6, 4.5, 4.6, нормировка к разным значениям, варьирующимся от 1,0 до 0,5, на рисунках 4.5 и 4.6, использование англоязычных или смешанных подписей осей и размерностей величин на всех рисунках в главах 3-5, отсутствие подписей осей на рис. 3.4с и 3.5, отсутствие шкалы на осях на рис. 3.4а,b и 5.1, несоответствие подписи осей подписи к рисунку на рисунках 3.4, 3.5, 5.3, что затрудняет восприятие основного материала диссертации.

3. Вместо запятой для разделения целых и десятых в десятичных дробях в русскоязычном тексте использована точка.

По тексту диссертации также можно также сделать следующие замечания и задать следующие вопросы:

1. В формулу (4) для расчета квантового выхода (с. 51) введен множитель $\lambda_{ст.}/\lambda_{из.}$, отсутствующий в оригинальной работе S. Fery-Forgues (doi:10.1021/ed076p1260, ссылка [160]). Какие экспериментальные и

теоретические предпосылки существуют для введения этого поправочного коэффициента для расчетов квантового выхода в диссертационной работе?

2. Для получения конъюгатов (5-FAM)₂, 5-FAM и 6-FAM с белками, флуоресцентные метки, как следует из методики (с.54), были взяты в двукратном избытке. Контролировали ли экспериментально число флуоресцентных меток, приходящихся на одну макромолекулу БСА и IgG в полученных конъюгатах? Возможно ли тушение флуоресценции меток в конъюгатах с белками при введении более одной метки на макромолекулу?

3. Физический смысл спектра поглощения и спектра возбуждения флуоресценции различен, их регистрируют в разных условиях. Спектр возбуждения флуоресценции более чувствителен к ассоциации красителя и наличию примесей. Совместный анализ изменений в спектре поглощения и в спектре возбуждения флуоресценции (5-FAM)₂ и (6-FAM)₂ при изменении pH позволил бы более полно охарактеризовать интервал pH, в котором рационально использовать бифлуорофоры.

4. Почему не определены экспериментально коэффициенты экстинкции известных и новых синтезированных производных ксантоновых и цианиновых красителей и их конъюгатов? Эти данные позволили бы полнее охарактеризовать новые соединения и зависимость их спектральных свойств от различных параметров.

5. Второе предложение пункта 5 раздела «Научная новизна» предлагаю изложить в новой редакции. Было: «Установлены количественные корреляции между концентрацией красителя (Sybr Green I), анизотропией флуоресценции и временем жизни возбужденного состояния...». Новая редакция: «Установлены количественные корреляции между анизотропией флуоресценции, временем жизни возбужденного состояния и концентрацией красителя (Sybr Green I)...».

9. Соответствие (несоответствие) научной квалификации соискателя учёной степени, на которую он претендует.

Диссертационная работа Ф. Фань «Синтез и физико-химические свойства флуоресцентных биоконъюгатов» является самостоятельно выполненной квалификационной работой, содержит новые научные данные и практически

важные рекомендации, структура и содержание работы соответствуют теме исследования и отражают личный вклад соискателя в решение актуальной задачи физической химии, связанной с дизайном новых производных ксантовых и цианиновых красителей с заданными физико-химическими свойствами для использования в качестве флуоресцентных меток сложных молекул. Научная квалификация Ф. Фань соответствует требованиям п.20-21 «Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь» (Указ Президента Республики Беларусь от 17.11.2004 г. № 560 в редакции Указа Президента республики Беларусь от 02.06.2022 г. № 190) к соискателю ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.04 – Физическая химия.

Считаю, что диссертация соответствует установленным требованиям и соискателю Фань Фань может быть присуждена ученая степень кандидата химических наук по специальности 02.00.04 – Физическая химия за следующие научные результаты:

- 1) разработку дизайна молекул новых красителей ксантового ряда с усиленной флуоресценцией, бифлуорофоров на основе фрагментов 5-флуоресцеина и 6-флуоресцеина, связанных через аминокислоты 3,5-диаминобензойной кислоты, карбоксильная группа которой модифицирована линкером с концевой азидной группой для конъюгирования с биомолекулами по реакции азид-алкинового присоединения;
- 2) впервые полученные данные о спектральных характеристиках бифлуорофоров с фрагментами 5- и 6- флуоресцеина в зависимости от микроокружения: концентрации поверхностно-активного соединения, вязкости, ионной силы раствора, присутствия двухзарядных катионов, pH, и температуры, а также влияния на них конъюгации с белками, что позволило выбрать бифлуорофор с повышенной стабильностью спектральных характеристик для решения прикладных задач;
- 3) впервые установленные данные о влиянии микроокружения (вязкости, добавки солубилизатора) и структуры молекул (наличие сульфогруппы, конъюгирование с олигонуклеотидом T10 или полиэтиленгликолем) на флуоресцентные свойства цианиновых красителей Cy3 и Cy5 в водных растворах, что позволяет уменьшить ошибки при их использовании в сложных системах;

4) впервые установленную взаимосвязь положения максимумов поглощения и флуоресценции, а также интенсивности эмиссии новых производных цианиновых красителей Cy5 и Cy7 со структурой основного флуоресцентного фрагмента, структурой и положением линкера в различных местах индольного кольца и метиновом мостике, а также степенью гибридизации ДНК, что позволяет эффективно выбирать структуру реагента для получения конъюгатов с заданными свойствами;

5) совокупность данных по влиянию структуры олигонуклеотидов на спектральные свойства конъюгированных с ними производных цианиновых красителей Cy5 и Cy7 и интеркалирующего красителя Sybr Green I, что позволяет оценивать ее изменения под влиянием различных факторов;

что вносит важный вклад в развитие физической химии флуоресцентных красителей.

Официальный оппонент:

ведущий научный сотрудник

Лаборатории «Материалы и технологии ЖК устройств»

Государственного научного учреждения

«Институт химии новых материалов

Национальной академии наук Беларуси»,

кандидат химических наук, доцент

28.11.2025

Шутова Т. Г.

Копия Шутовой Т. Г. утверждено

Ведущий специалист
по кадрам



ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ИНСТИТУТ ФИЗИКО-ОРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ»
Минск
Вход. № 202-02-18/32
11.2025

Учен. секретарь О. А. Трачелло